

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
der Freien Universität Berlin  
Leiter: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

---

Auftrennung der 9 S RNS aus unreifen  
roten Hühner-Blutzellen in  
f2c-Histon mRNS und Globin mRNS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Walter Knöchel  
aus Marburg/Lahn

1976  
—







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41548818\\_0065](https://archive.org/details/IA41548818_0065)

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie  
der Freien Universität Berlin  
Leiter: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

---

Auftrennung der 9 S RNS aus unreifen  
roten Hühner-Blutzellen in  
f2c-Histon mRNS und Globin mRNS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Walter Knöchel  
aus Marburg/Lahn

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

Korreferent: Prof. Dr. H. J. Merker



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche  
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13. 5. 1976

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann danke ich für die Überlassung des Themas und die zur Verfügung gestellten Mittel. Sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie zahlreiche Diskussionen bedeuteten für mich eine große Hilfe.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich Embryonale Entwicklung und Differenzierung) danke ich für finanzielle Unterstützung.

Im Text gebrauchte Abkürzungen:

|           |                                                                               |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------|
| DNS       | Desoxyribonucleinsäure                                                        |
| RNS       | Ribonucleinsäure                                                              |
| mRNS      | messenger-Ribonucleinsäure                                                    |
| rRNS      | ribosomale Ribonucleinsäure                                                   |
| tRNS      | transfer-Ribonucleinsäure                                                     |
| mRNP      | messenger-Ribonucleoproteinkomplex                                            |
| EDTA      | Äthylendiamintetraessigsäure                                                  |
| SDS       | (sodium dodecyl sulfate) Natriumdodecyl-sulfat                                |
| S         | Sedimentationskonstante in Svedbergeinheiten (S) $(S) = 10^{-13} \text{ sec}$ |
| rpm       | (rotation per minute) Umdrehungen pro Minute                                  |
| cpm       | (counts per minute) Impulse pro Minute                                        |
| A         | Adenin                                                                        |
| C         | Cytosin                                                                       |
| G         | Guanin                                                                        |
| U         | Uracil                                                                        |
| T         | Thymin                                                                        |
| PPO       | 2,5 - Diphenyloxazol                                                          |
| Dimethyl- |                                                                               |
| POPOP     | 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyl-oxazolyl)-Benzol                                 |
| TMED      | N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin                                            |

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                | <u>Seite</u> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1. <u>Einleitung</u>                                                                           | 5            |
| 2. <u>Ziel der Arbeit</u>                                                                      | 8            |
| 3. <u>Methoden und Material</u>                                                                | 9            |
| 3.1. Isolierung von 9 S RNS aus unreifen roten Hühner-Blutzellen                               | 9            |
| 3.1.1. Gewinnung eines postmitochondrialen Überstandes                                         | 9            |
| 3.1.2. Isolierung der 9 S RNS aus dem postmitochondrialen Überstand                            | 10           |
| 3.2. Auftrennung der 9 S RNS nach dem Poly(A)-Gehalt durch Oligo(dT)-Cellulose                 | 11           |
| 3.3. Hybridisierung von fraktionierter 9 S RNS mit $^3\text{H}$ -Poly(U)                       | 12           |
| 3.4. Translation der 9 S RNS ( $\pm$ Poly(A) ) im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Zellen | 13           |
| 3.4.1. Präparation des zellfreien Systems                                                      | 13           |
| 3.4.2. Präparation einer ribosomalen Waschfraktion                                             | 14           |
| 3.4.3. Translation der RNS                                                                     | 14           |
| 3.5. Isolierung der Referenzsubstanzen (Globinketten und Histone) für die Produktanalyse       | 15           |
| 3.5.1. Isolierung von Globinketten                                                             | 15           |
| 3.5.2. Darstellung von $^{14}\text{C}$ -Leucin markierten Globinketten                         | 15           |
| 3.5.3. Isolierung von Histonen                                                                 | 16           |
| 3.6. Produktanalyse                                                                            | 16           |
| 3.6.1. Polyacrylamidelektrophorese                                                             | 17           |
| 3.6.2. Gelfiltration über Sephadex G 100                                                       | 18           |
| 3.6.3. Carboxymethylcellulose-Chromatographie                                                  | 18           |
| 3.7. Messung der Radioaktivität                                                                | 18           |

|                                                                          | <u>Seite</u> |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.7.1. Messung von Trichloressigsäure-gefälltem Material                 | 19           |
| 3.7.2. Messung in wässriger Lösung                                       | 19           |
| 3.7.3. Messung von Acrylamidgelscheiben                                  | 19           |
| 3.8. Lösungen und Puffer                                                 | 20           |
| 3.9. Chemikalien                                                         | 21           |
| 4. <u>Ergebnisse</u>                                                     | 23           |
| 4.1. Isolierung der 9 S RNS                                              | 23           |
| 4.2. Auftrennung der 9 S RNS nach dem Poly(A)-Gehalt                     | 26           |
| 4.3. Poly(A)-Gehalt der fraktionierten RNS                               | 30           |
| 4.4. Translation der RNS im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Zellen | 31           |
| 4.5. Produktanalysen                                                     | 32           |
| 4.5.1. Produktanalyse für Histone                                        | 32           |
| 4.5.2. Produktanalyse für Globinketten                                   | 35           |
| 5. <u>Diskussion</u>                                                     | 38           |
| 6. <u>Zusammenfassung</u>                                                | 42           |
| 7. <u>Literaturverzeichnis</u>                                           | 43           |

## 1. Einleitung

Im Jahre 1961 formulierten F. Jacob und J. Monod<sup>1</sup> in ihrer grundlegenden Arbeit über genetische Regulationsmechanismen bei der Proteinsynthese die Hypothese, daß nur eine bestimmte RNS, sogenannte messenger RNS (mRNS), für die Informationsübertragung von der DNS zum Protein in Frage kommt. Obwohl viele Argumente, darunter die erfolgreiche Translation viraler mRNS und synthetischer Polyribonucleotide in zellfreien Proteinsynthesesystemen für diese Annahme sprachen (siehe Übersichtsartikel von M. F. Singer und P. Leder<sup>2</sup>), dauerte es noch fast 10 Jahre, bis mRNS für bestimmte Proteine aus den Zellen von Eukaryonten isoliert und ihre Funktion als mRNS nachgewiesen werden konnte.

Die Schwierigkeit lag einmal darin, daß die mRNS mit

nur 1-5 % den geringsten Anteil der zellulären RNS ausmacht, zum anderen, daß sie sich auf Grund ihrer heterogenen Größenverteilung durch Ultrazentrifugation nur unzureichend von rRNS abtrennen ließ. Eine Ausnahme bildete die aus unreifen roten Blutzellen gewonnene Globin mRNS, die als erste mRNS weitgehend angereichert werden konnte (H. Chantrenne et al.<sup>3</sup>). 80-90 % der in Retikulozyten synthetisierten Proteine sind Globin-Ketten (K. Scherrer und L. Marcaud<sup>4</sup>). Globin mRNS, die bei ca. 9 S sedimentiert, ließ sich durch Zentrifugation in Saccharose-Gradienten leicht von tRNS (4 S) und rRNS (5 S, 18 S und 28 S) abtrennen.

1970 begann mit der Entdeckung, daß mRNS eukaryotischer Zellen am 3' -OH Ende eine Poly(A)-Sequenz besitzt (J. Kates<sup>5</sup>, J. Mendecki et al.<sup>6</sup>, G. R. Molloy et al.<sup>7</sup>), und der Entwicklung geeigneter Bindungsverfahren zur Abtrennung von RNS-Molekülen mit dieser Sequenz eine stürmische Entwicklung auf dem Gebiet der Isolierung von mRNS aus den verschiedensten Geweben. Durch nachfolgende Auftrennung über Polyacrylamidgelelektrophorese oder Zentrifugation in Saccharose-Gradienten erhielt man für bestimmte Proteine spezifische mRNS, die in vivo oder in zellfreien Systemen in vitro in die entsprechenden Proteine translatiert wurde (siehe Übersichtsartikel von M. B. Mathews<sup>8</sup>). Für Histon mRNS aus verschiedenen Organismen konnten jedoch bislang als einzige Ausnahme keine derartigen Poly(A)-Sequenzen nachgewiesen werden (M. Adesnik und J. E. Darnell<sup>9</sup>, J. R. Greenberg und R. P. Perry<sup>10</sup>, M. Nemer<sup>11</sup>).

Seit einigen Jahren ist bekannt, daß 9 S RNS aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern Globin mRNS enthält (W. Knöchel et al.<sup>12</sup>). Diese kernhaltigen Zellen sind, da sie noch eine RNS-Synthese aufweisen und überwiegend nur ein Protein, nämlich Globin, synthetisieren, für Ex-

perimente zur Untersuchung des Informationstransfers vom Kern zum Cytoplasma besonders geeignet. Andererseits konnten R. Appels und J. R. E. Wells<sup>13</sup> zeigen, daß diese Zellen, obwohl sie sich nicht mehr teilen, noch f2c-Histon synthetisieren, das neben f1-Histon maßgeblich an der Chromatinkondensation beteiligt sein soll (M. A. Billet und J. M. Barry<sup>14</sup>). Die Beobachtung, daß Histon mRNS aus HeLa Zellen im Bereich von 7 bis 9 S sedimentiert (M. Adesnik und J. E. Darnell<sup>9</sup>, M. Breindl und D. Gallwitz<sup>15</sup>, M. Jacobs-Lorena et al.<sup>16</sup>) sowie das bekannte Molekulargewicht des f2c-Histons (21 450) (A. Garel et al.<sup>17</sup>), das eine mRNS mit dem Molekulargewicht von etwa 200 000 Dalton erfordert, lassen vermuten, daß 9 S RNS aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern neben Globin mRNS auch f2c-Histon mRNS enthält. Eine Trennung beider Spezies wäre im Hinblick auf die Untersuchung der Kontrollmechanismen bei der Transkription der entsprechenden Gene wünschenswert.

## 2. Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die 9 S RNS Fraktion aus unreifen roten Hühner-Blutzellen in Globin mRNA und f2c-Histon mRNA aufzutrennen. Da Hühner-Erythroblasten f2c-Histon synthetisieren (R. Appels und J. R. E. Wells<sup>13</sup>) und dieses Protein ein Molekulargewicht von 21 450 Dalton hat (A. Garel et al.<sup>17</sup>), war zu erwarten, daß 9 S RNS neben Globin mRNA auch mRNA für f2c-Histon enthält.

Da Histon mRNA aus anderen Geweben im Gegensatz zu Globin mRNA keine Poly(A)-Sequenz am 3'-OH Ende besitzt (M. Adesnik und J. E. Darnell<sup>9</sup>, J. R. Greenberg und R. P. Perry<sup>10</sup>, M. Nemer<sup>11</sup>), sollte versucht werden, beide RNS Spezies durch eine Poly(A)-Hybridisierungstechnik zu trennen. Der Nachweis der Globin mRNA und der f2c-Histon mRNA sollte dann durch Translation im zellfreien System der Proteinbiosynthese aus Ehrlich-Aszites-Tumorzellen mit anschließender Produktanalyse für Globin und f2c-Histon erbracht werden.

### 3. Methoden und Material

#### 3.1. Isolierung von 9 S RNS aus unreifen roten Hühner-Blutzellen (W. Knöchel et al.<sup>12</sup>)

##### 3.1.1. Gewinnung eines postmitochondrialen Überstandes

Zur Gewinnung der Zellen dienten ca. 1 Jahr alte Hühner der Rasse weißes Leghorn (Gewicht 1 - 1,5 kg). Die Tiere wurden anämisch gemacht, indem ihnen an vier aufeinanderfolgenden Tagen eine Phenylhydrazinlösung (2,5 %; pH 7,5; 10 mg/kg) subkutan injiziert wurde (H. Schall und F. Turba<sup>18</sup>). Nach einem Ruhetag wurden die Tiere am sechsten Tag in Äthernarkose nach Freilegen der Jugularisvene ad exitum entblutet, wobei die Gerinnung durch Zugabe von 1/10 Volumen 5 % Natriumcitratlösung vermieden wurde.

Die folgenden Arbeiten wurden im Eisbad beziehungsweise bei Temperaturen unter 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Christ Kühlzentrifuge bei 1 500 x g abzentrifugiert. Das Plasma sowie die auf den roten Zellen liegende Schicht weißer Blutzellen wurde mittels einer Pasteurpipette durch Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Die roten Zellen wurden im dreifachen Volumen Puffer 1 aufgenommen, gut vermischt, wiederum bei 1 500 x g abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt.

Zur Lysis wurden die gewaschenen Zellen im 5fachen Volumen Puffer 2 aufgenommen und 5 Minuten schwach gerührt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Puffer 3 (bezogen auf das Volumen von Puffer 2) wurde die Lösung zur quantitativen Zerstörung der Zellen mittels eines lokker eingepaßten Dounce Homogenisators mit drei bis fünf Strokes nachhomogenisiert.

Das Lysat wurde zur Entfernung von Zellkernen, Mitochondrien und nicht aufgeschlossenen Zellen 15 Minuten bei 0°C und 11 000 rpm im Spinco Al 30 Rotor zentrifugiert. Die Sedimente wurden verworfen, der Überstand als postmitochondrialer Überstand weiterverarbeitet.

### 3.1.2. Isolierung der 9 S RNS aus dem postmitochondrialen Überstand

Der postmitochondriale Überstand wurde in einem Spinco Ti 60 Rotor 2 Stunden bei 0°C und 50 000 rpm zentrifugiert, wobei ein Kissen von 1 bis 2 ml 0,8 M Saccharose in Puffer 4 bewirkte, daß die abzentrifugierten Polysomen weitgehend frei von Verunreinigungen waren. Die Polysomen wurden dann in Puffer 5 aufgenommen (ca. 300 mg/10 ml) und die Lösung 0,03 M an EDTA gemacht. Das so in Untereinheiten und mRNP dissoziierte Material wurde für 24 Stunden in einem Spinco Zonal Rotor Ti 14 bei 0°C und 32 000 rpm durch einen 7 - 32 % Saccharosegradienten (Gewicht/Volumen) in Puffer 5 zentrifugiert.

Der Gradient wurde mittels einer Desaga Schlauchpumpe eluiert und in einem Fraktionensammler LKB Ultro Rac 7000 fraktioniert (10 ml/Fraktion). Die Extinktion bei 254 nm wurde mit einem LKB Uvicord II registriert, an das ein Beckman 10'' Schreiber mit TE-Wandler angeschlossen war.

Die Fraktionen, die den mRNP Komplex enthielten, wurden vereinigt, mit 1 % SDS und 1,5 % NaCl versetzt und mit 2 Volumen 96 % Äthanol gefällt. Das Präzipitat wurde dann im Spinco SW 27 Rotor für 45 Stunden bei 0°C und 27 000 rpm durch einen 12 - 30 % Saccharosegradienten (Gewicht/Volumen) in Puffer 5 zentrifugiert. Die Fraktionierung (2 ml/Fraktion) und Extinktionsmessung erfolgte wie bereits beschrieben. Die Fraktionen, die das

bei 9 - 10 S sedimentierende Material enthielten, wurden vereinigt. Um restliche an der RNS gebundene Proteine zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion durchgeführt (H. Aviv und P. Leder<sup>19</sup>). Die RNS wurde mit 2 Volumen 96 % Äthanol gefällt, zweimal mit 66 % Äthanol, 0,5 % NaCl und einmal mit 66 % Äthanol, Äther (2:1) gewaschen. Nach kurzem Trocknen im Vakuum der Ölpumpe wurde das Material in destilliertem Wasser in einer Endkonzentration von 1 mg/ml aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.2. Auftrennung der 9 S RNS nach dem Poly(A)-Gehalt durch Oligo(dT)-Cellulose (H. Aviv und P. Leder<sup>19</sup>)

Auf Grund der Ergebnisse über die Trenneigenschaften von Cellulose, Poly(U)-Sephrose und verschiedenen Oligo(dT)-Cellulose Chargen (siehe Ergebnisse) erwies sich Oligo(dT)-Cellulose der Klassifizierung T<sub>3</sub> von Collaborative Research am geeignetsten. Es wurden Pasteur Pipetten (2 ml Inhalt) mit 0,5 g Oligo(dT)-Cellulose in Puffer 6 gefüllt, die zunächst mit Puffer 8 und dann mit Puffer 6 äquilibriert wurden. Für die Vorversuche mit Cellulose wurde Puffer 6 0,2 mM an MgCl<sub>2</sub> verwendet (G. Schutz et al.<sup>20</sup>), bei Poly(U)-Sephrose wurde das Material in Puffer 9 aufgetragen (R. A. Firtel et al.<sup>21</sup>).

250 µg 9 S RNS wurden in 0,5 M an KCl und 0,01 M an Tris (pH 7,5) Puffer gelöst und aufgetragen. Die Elution erfolgte stufenweise bei 4°C mit den Puffern 6, 7 und 8. Die Extinktion des Eluates bei 254 nm wurde mit einem Serva Chromatocord Photometer kontinuierlich gemessen. Die Puffer wurden gewechselt, wenn die Extinktion die Basislinie erreicht hatte. Nach Fraktionierung des Eluates (0,5 ml/Fraktion) wurden die einzelnen Fraktionen in einem Bausch & Lomb Spektralphotometer bei

260 nm nachgemessen, die RNS enthaltenen Fraktionen der jeweiligen drei Eluate vereinigt und mit 2 Volumen 96 % Äthanol versetzt. Die RNS-Präzipitate I bis III wurden in destilliertem Wasser aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.3. Hybridisierung von fraktionierter 9 S RNS mit $^3\text{H}$ -Poly(U) (A. Cann et al.<sup>22</sup>)

Zur Untersuchung des Poly(A)-Gehaltes wurden 0,96  $\mu\text{g}$  RNS I beziehungsweise 0,462  $\mu\text{g}$  RNS III mit je 0,01  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Poly(U) (11,7  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  P) in 0,6 ml Puffer 10 für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden je zwei Aliquote von 250  $\mu\text{l}$  entnommen und einmal mit 0,8 ml Puffer 11, zum anderen mit 0,8 ml Puffer 11, der 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A und 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase I enthielt, versetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 2 Stunden bei 30°C wurde das Material nach Zugabe von 0,2 ml Globulin als Träger (1 mg/ml) mit 30 % Trichloressigsäure, 0,01 % Uridin gefällt, zweimal gewaschen und die Radioaktivität gemessen.

Zur Berechnung der durchschnittlichen Poly(A)-Länge multipliziert man den Quotienten der Aktivität des Nuclease behandelten Ansatzes, dividiert durch die Aktivität des Ansatzes ohne Nucleasen, mit dem Quotienten der Mole Uridin, dividiert durch die Mole 9 S RNS im Ansatz:

$$\text{Sequenz} = \frac{\text{cpm Ansatz mit Nucleasen}}{\text{cpm Ansatz ohne Nucleasen}} \times \frac{[\text{Uridin}]}{[\text{9 S RNS}]}$$

Die Mole Uridin errechnet man aus der spezifischen Aktivität des  $^3\text{H}$ -Poly(U). Für 9 S RNS wurde ein Molekulargewicht von 200 000 Dalton eingesetzt, so daß 1  $\mu\text{g}$  9 S RNS  $5 \times 10^{-12}$  Molen entspricht.

### 3.4. Translation der 9 S RNS ( $\pm$ Poly(A) ) im zellfreien System aus Ehrlich Ascites Zellen (M. Mathews und A. Korner<sup>23</sup>)

#### 3.4.1. Präparation des zellfreien Systems

Ehrlich Ascites Zellen der Maus wurden freundlicherweise von Prof. Dr. E. Liss, Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, zur Verfügung gestellt und durch intraperitoneale Transplantation weiter gezüchtet. Nach 9 bis 10 Tagen wurden die Tiere durch zervicale Dislokation getötet und der Ascites entnommen. Die Zellen wurden bei 1 500 x g abzentrifugiert und der Überstand, der auch die roten Blutzellen enthielt, mit einer Pasteurpipette im Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Nach mehrmaligem Waschen in Puffer 12 wurden die Zellen in 2 Volumen Puffer 13 unter schwachem Rühren 10 Minuten lysiert und zur vollständigen Zerstörung der Zellen in einem fest eingepaßten Dounce Homogenisator mit 30 Strokes nachhomogenisiert.

Nach Zugabe von 1/10 Volumen Puffer 14 (bezogen auf das Volumen von Puffer 13) wurde das Lysat zur Entfernung von Zellkernen, Mitochondrien und nicht aufgeschlossenen Zellen 15 Minuten im Spinco Al 30 Rotor bei 0°C und 13 000 rpm zentrifugiert. Der postmitochondriale Überstand wurde ohne die Lipidschicht abgenommen und nach Zugabe von 1/100 Volumen einer 5 mM Lösung von 20 Aminosäuren und 1/20 Volumen einer Lösung von 20 mM ATP, 2 mM GTP, 40 mg Kreatinphosphat/ml, 4 mg Kreatinkinase/ml bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, um die endogene Proteinsynthese herabzusetzen. Die Lösung wurde dann auf eine mit Puffer 15 äquilibrierte Sephadex G 25 Säule (18 x 2 cm) aufgetragen, das Eluat in 0,5 ml Fraktionen fraktioniert und das hochmolekulare Material nach Entnahme eines Aliquots zur Extinktionsmessung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.4.2. Präparation einer ribosomalen Waschfraktion (S. M. Heywood<sup>24</sup>)

Ca. 100 mg Polysomen aus unreifen roten Hühner-Blutzellen wurden in 2 ml Puffer 16 aufgenommen und 1 Stunde bei 0°C vorsichtig gerührt (Vermeiden von Schaumbildung). Danach wurde die Lösung 2 Stunden bei 48 000 rpm und 0°C im Spinco Ti 50 Rotor zentrifugiert und der Überstand auf eine mit Puffer 17 äquilibrierte Sephadex G 25 Säule (18 x 2 cm) aufgetragen. Die hochmolekularen Anteile des Eluates wurden gesammelt (0,3 ml/Fraktion), ein Aliquot zur Aktivitätsmessung entnommen und der Rest in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.4.3. Translation der RNS

Die Translation der RNS wurde in 50 µl Ansätzen bzw. einem Vielfachen davon durchgeführt. Die 50 µl Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

|                       |                                                              |        |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|--------|
| 0,4 E <sub>260</sub>  | Einheiten des 30 Minuten vorinkubierten<br>Ascites Extraktes | 8,0 µl |
| 18                    | Aminosäuren (Endkonzentration: 50 µM)                        | 0,5 µl |
|                       | Cystein (Endkonzentration: 50 µM)                            | 0,5 µl |
|                       | <sup>3</sup> H-Lysin (2,5 µCi)                               | 2,5 µl |
| EGS                   | (Energie regenerierendes System)                             |        |
|                       | ATP (Endkonzentration: 1 mM)                                 |        |
|                       | GTP (Endkonzentration: 0,1 mM)                               |        |
|                       | Kreatinphosphat (Endkonzentration: 5 mM)                     |        |
|                       | 10 µg Kreatinkinase                                          | 2,5 µl |
| 0,06 E <sub>280</sub> | Einheiten der ribosomalen Waschfraktion                      | 8,5 µl |
| 20 x M                | Puffer                                                       |        |
|                       | KCl (Endkonzentration: 95 mM)                                |        |
|                       | MgCl <sub>2</sub> (Endkonzentration: 2,5 mM)                 |        |

|                                             |                               |
|---------------------------------------------|-------------------------------|
| Tris-HCl, pH 7,5 (Endkonzentration: 20 mM)  |                               |
| 2-Mercaptoäthanol (Endkonzentration: 7 mM)  | 2,5 $\mu$ l                   |
| 2 $\mu$ g 9 S RNS und/oder H <sub>2</sub> O | <u>25,0 <math>\mu</math>l</u> |
|                                             | 50 $\mu$ l                    |

Die Ansätze wurden 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung des <sup>3</sup>H-Lysin Gesamteinbaus in Proteine wurde die zellfreie Proteinsynthese durch Zugabe von 0,2 ml 0,1 M KOH, die 10 mM kaltes Lysin enthielt, zur Hydrolyse von Aminoacyl-tRNS gestoppt. Nach einer weiteren Inkubation von 20 Minuten wurde das Material mit 30 % Trichloressigsäure gefällt und zur Radioaktivitätsmessung vorbereitet.

### 3.5. Isolierung der Referenzsubstanzen (Globinketten und Histone) für die Produktanalyse

#### 3.5.1. Isolierung von Globinketten (R. E. Lockard und J. B. Lingrel<sup>25</sup>)

10 ml eines 100 000 x g Überstandes aus dem Lysat unreifer roter Hühner-Blutzellen wurde bei -15°C (Eis/Kochsalz) tropfenweise zu einer Mischung von 17,5 g Oxalsäure in 500 ml Aceton (0,035 M an HCl) zugegeben. Das Präzipitat wurde sofort bei -15°C und 4 000 x g für 2 Minuten abzentrifugiert und noch zweimal bei -15°C mit reinem Aceton gewaschen. Nach vollständigem Trocknen im Vakuum der Ölpumpe wurde das Material in 10 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und die Fällung wiederholt. Die so gereinigten Ketten wurden bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.5.2. Darstellung von <sup>14</sup>C-Leucin markierten Globinketten

<sup>14</sup>C markierte Globinketten wurden in Anlehnung an G. Shapira et al.<sup>26</sup> dargestellt. Unreife rote Hühner-Blutzellen wurden wie bereits beschrieben isoliert und zusätzlich noch einmal mit Puffer 18 gewaschen. Dann wur-

den zu 10 ml Zellen 9 ml Puffer 18, 0,4 ml 0,117 % Eisen-Ammonium-Sulfat, 0,25 ml einer Aminosäuremischung (19 Aminosäuren, je 5 mM), 0,25 ml 5 mM Cystein und 1 ml  $^{14}\text{C}$  Leucin (50  $\mu\text{Ci}$ ) zugesetzt. Die Zellsuspension wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Erlenmeyer Kolben im Schüttelbad für 4 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, dreimal gewaschen und lysiert. Die Globinketten wurden aus dem 100 000 xg Überstand durch saure Acetonfällung isoliert.

### 3.5.3. Isolierung von Histonen (R. Appels und J. R. E. Wells<sup>13)</sup>)

Zur Gewinnung reiner Zellkerne aus unreifen roten Blutzellen wurde die Lyse in Gegenwart von 0,5 % Triton X 100 durchgeführt. Die durch Zentrifugation bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 5 000 rpm für 10 Minuten im Spinco Al 30 Rotor erhaltene rohe Kernfraktion wurde nacheinander in je 20 Volumen Puffer 19, Puffer 20 und Puffer 21 gewaschen. Je 5 ml Kerne wurden in 30 ml 2 M NaCl, 5 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  aufgenommen, 30 Minuten bei  $0^{\circ}\text{C}$  unter gelegentlichem Schütteln stehen gelassen und dann durch Zugabe von 0,75 ml 10 M HCl auf eine Endkonzentration von 0,25 M an HCl gebracht. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Lösung in Polyallomer Bechern im Spinco SW 27 Rotor bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 19 000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Quarz-Watte in einen Dialyseschlauch filtriert und 12 Stunden bei dreimaligem Wechsel gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Lösung wurde lyophilisiert und das Material bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.6. Produktanalyse

Zur Untersuchung, ob 9 S RNS Globinketten und/oder Histone codiert, wurden 30fache Ansätze des zellfreien

Systems (1,5 ml) mit 60  $\mu\text{g}$  RNS inkubiert. Nach 60 Minuten bei 37°C wurden 50  $\mu\text{l}$  entnommen und zur Bestimmung des  $^3\text{H}$ -Lysin Gesamteinbaus nach KOH Hydrolyse der RNS einer Radioaktivitätsmessung unterworfen.

Der Hauptanteil der Ansätze wurde im Eisbad abgekühlt und mit 15 ml 2 M NaCl, 5 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  versetzt. Nach 30 Minuten wurden 0,5 ml 10 M HCl zugegeben und nach weiteren 30 Minuten wurden die Lösungen im Spinco SW 27 Rotor bei 0°C und 19 000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Die Sedimente wurden für die Globinkettenanalyse weiter verarbeitet. Die Überstände wurden 48 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysiert (6 x gewechselt) und anschließend lyophilisiert. Das Material wurde in 50  $\mu\text{l}$  1 M Harnstoff (pH 2,8) aufgenommen und durch Polyacrylamidelektrophorese weiter aufgetrennt.

### 3.6.1 Polyacrylamidelektrophorese

Polyacrylamidelektrophoresen wurden in Anlehnung an S. Panyim und R. Chalkley<sup>27</sup> durchgeführt. Die Lösungen 20, 23 und 24 wurden im Verhältnis 2 : 1 : 5 gemischt, kurz evakuiert, in Kunststoffröhrchen gegossen (10 x 0,6 cm) und über Nacht zur vollständigen Polymerisation stehen gelassen. Die so hergestellten 15 % Gele wurden nach einer Modifikation von R. Appels et al.<sup>28</sup> in 1 M Harnstoff, pH 2,8 (eingestellt mit Eisessig) 5 Stunden bei 2 mA/Gel der Vorelektrophorese unterworfen. Nach Erneuerung der Elektrodenpuffer wurde die Probelösung, die mit einigen Saccharosekristallen versetzt war, aufgetragen. Zur Konzentrierung des Materials wurde 15 Minuten eine Stromstärke von 0,5 mA/Gel angelegt, die eigentliche Elektrophorese dann bei 2 mA/Gel für 5 Stunden durchgeführt. Danach wurden die Gele vorsichtig aus den Röhrchen entfernt und die Länge in cm gemessen. Für die Radioaktivitätsbestimmung wurden die Gele dann

mittels eines Gelschneidegerätes der Fa. Mickle Laboratory Engineering Co. in 1 mm Scheibchen geschnitten. Zur Extinktionsmessung wurden die Gele 3 Minuten in Amidoschwarz gefärbt, 2 Tage in 10 % Essigsäure entfärbt und die Extinktion in einem Gilford Spektralphotometer Typ 2400-S bei 605 nm gemessen. Die Banden wurden vermessen und auf ihre ursprüngliche Position im ungequollenen Gel zurückberechnet.

### 3.6.2. Gelfiltration über Sephadex G 100

Zur Untersuchung auf Globinkettensynthese wurde das Sediment der Histonextraktion in 1,5 ml 7 M Harnstoff, pH 2,5 (eingestellt mit 10 M HCl) aufgenommen. Nach Zugabe von 20 mg unmarkierten Globinketten wurde die Lösung auf eine Sephadex G 100 Säule (100 x 1,6 cm) aufgetragen, die mit 7 M Harnstoff, pH 2,5 (eingestellt mit 10 M HCl) äquilibriert war. Die Extinktion des Eluates wurde bei 280 nm gemessen. Von den Fraktionen wurden je 0,2 ml entnommen und wie unter 3.7.2. beschrieben zur Radioaktivitätsmessung aufgearbeitet.

### 3.6.3. Carboxymethylcellulose-Chromatographie

Die Fraktionen der Sephadex G 100 Säule, die die Globinketten enthielten, wurden vereinigt und nach 12 St. Dialyse gegen Puffer 25 auf Carboxymethylcellulose-säulen (CM 52, Whatman) (15 x 0,6 cm) aufgetragen. Die Trennung der Globinketten wurde durch einen linearen 100 ml Gradienten (50 ml Puffer 25, 50 ml Puffer 26) erreicht. Die Extinktion des Eluates wurde bei 280 nm gemessen. Fraktionen zu 1,5 ml wurden gesammelt, von denen jeweils 0,5 ml zur Radioaktivitätsmessung entnommen wurden (siehe 3.7.2.).

## 3.7. Messung der Radioaktivität

### 3.7.1. Messung von Trichloressigsäure-gefälltem Material

Zu der Probe wurden bei 0°C zur quantitativen Fällung als Träger 0,3 ml einer Rinderalbuminlösung (1 mg/ml) gegeben und gut durchmischt. Nach Zugabe von 0,2 ml 30 % Trichloressigsäure und nach erneutem Mischen wurde die Probe 5 Minuten stehen gelassen, wobei sämtliches hochmolekulares Trichloressigsäure-fällbares Material ausfiel. Danach wurde in einer Christ Kühlzentrifuge 10 Minuten bei 0°C und 4 000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment noch zweimal mit 5 % Trichloressigsäure gewaschen. Nach Auswischen des Probenröhrchens mit einer Filterpapierfahne wurde das Sediment in 0,5 ml Hyamin (1 M in Methanol) aufgenommen und zur vollständigen Auflösung 10 Minuten bei 57°C inkubiert. Die Messung erfolgte in 10 ml Omnifluor/Toluol Cocktail (4 g/l) in einem Beckman LS 150 Flüssigkeits-Szintillationszähler.

### 3.7.2. Messung in wässrigen Lösungen (D. Hendrick et al.<sup>29)</sup>)

Die zur Radioaktivitätsmessung entnommenen Aliquote wurden zu 15 ml eines Cocktails aus 7,5 g PPO, 0,15 g Dimethyl-POPOP in 670 ml Toluol, 330 ml Äthylenglycolmonomethyläther und 35 ml Hyamin (1 M in Methanol) gegeben. Die Messung erfolgte dann im Szintillationszähler.

### 3.7.3. Messung von Acrylamidgelscheibchen

Die Gelscheibchen wurden in Glasfläschchen überführt, mit 0,5 ml einer Mischung von NCS/Wasser (10:1) versetzt, die Fläschchen gut verschlossen und über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde dann auf

jede Probe 10 ml eines Cocktails aus 6 g PPO und 0,075 g POPOP in 1 l Toluol gegeben. Die Messung erfolgte nach 48 Stunden im Szintillationszähler (M. Zaitlin und V. Hariharasubramanian<sup>30</sup>).

### 3.8. Lösungen und Puffer

- 1 0,14 M NaCl, 0,004 M MgCl<sub>2</sub>, 0,005 M KCl, 0,01 M Tris (pH 7,4).
- 2 0,004 M MgCl<sub>2</sub>, 0,01 M Tris (pH 7,5), 0,02 M KCl. Der Puffer wurde vor Gebrauch 6 mM an 2-Mercaptoäthanol gemacht.
- 3 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M Tris (pH 7,5), 0,8 M KCl. Der Puffer wurde vor Gebrauch 60 mM an 2-Mercaptoäthanol gemacht.
- 4 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris (pH 7,5), 0,1 M KCl. Der Puffer wurde vor Gebrauch 6 mM an 2-Mercaptoäthanol gemacht.
- 5 80 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7,5).
- 6 0,5 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5).
- 7 0,1 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5).
- 8 10 mM Tris (pH 7,5).
- 9 0,12 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 % SDS, 10 mM Tris (pH 7,6).
- 10 0,45 M NaCl, 0,045 M Natriumcitrat, 50 % Formamid, 3 mM Tris (pH 7,0).
- 11 0,5 M NaCl, 0,01 M MgCl<sub>2</sub>, 0,01 M Tris (pH 7,0).
- 12 0,146 M NaCl, 10 mM Tris (pH 7,8).
- 13 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM KCl, 10 mM Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 6 mM an 2-Mercaptoäthanol gemacht.
- 14 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 M KCl, 0,2 M Tris (pH 7,5).
- 15 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM KCl, 20 mM Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 7 mM an 2-Mercaptoäthanol gebracht.
- 16 0,5 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5).
- 17 0,1 M KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris (pH 7,5).

- 18 9 g NaCl, 0,46 g KCl, 0,48 g KCl, 0,48 g CaCl<sub>2</sub>  
x 2 H<sub>2</sub>O, 0,21 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,328 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O,  
H<sub>2</sub>O ad 1 l mit ges. Na-bicarbonatlösung auf  
pH 7,1 eingestellt.
- 19 0,25 M Saccharose, 0,5 % Triton X 100, 5 mM Na<sub>2</sub>  
S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.
- 20 0,008 M NaCl, 0,02 M EDTA, 5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.
- 21 0,147 M NaCl, 5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.
- 22 60 g Acrylamid, 0,4 g Bisacrylamid, ad 100 ml H<sub>2</sub>O.
- 23 43,2 ml Eisessig, 4 g TMED, ad 100 ml H<sub>2</sub>O.
- 24 0,2 g Ammoniumpersulfat, 60 g Harnstoff, ad 100 ml  
H<sub>2</sub>O.
- 25 6 M Harnstoff, 0,127 M Ameisensäure, pH 3,54 ein-  
gestellt mit Triäthylamin.
- 26 6 M Harnstoff, 0,508 M Ameisensäure, pH 5,14 ein-  
gestellt mit Triäthylamin.

### 3.9. Chemikalien

Chemikalien folgender Firmen wurden verwendet:

L-<sup>14</sup>C-Leucin (348 Ci/mol) und L-<sup>3</sup>H-Lysin (19 Ci/mmol),  
Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Wenden über Braun-  
schweig.

<sup>3</sup>H-Poly(U) (11,7 mCi/mMol P), Schwarz/Mann, Division of  
Becton, Dickinson and Company, Orangeburg, New York, USA.  
Hyamin (1 M in Methanol), Fa. Packard Instrument Inter-  
national S. A., Zürich/Schweiz.

NCS Lösungsvermittler, Omnifluor, Fa. New England Nu-  
clear, Dreieichenhain/Frankfurt.

PPO, Dimethyl-POPOP, Fa. Werner Zinsser, Frankfurt.

Saccharose (frei von Ribonuclease), Triton X 100, Natri-  
umdodecylsulfat, TMED, Acrylamid und Bisacrylamid, Fa.  
Serva, Heidelberg.

EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure) p. A., Triäthyla-  
min p. A., Trichloressigsäure p. A. und Rinderalbumin,  
Fa. Merck, Darmstadt.

Oligo(dT)-Cellulose, Collaborative Research, Inc.,  
Waltham, Mass., USA.

Sigmacell type 38 - Cellulose, Sigma Chemical Company,  
St. Louis, Miss., USA.

Poly(U)-Sephrose 4 B, Pharmacia Fine Chemicals AB,  
Uppsala, Schweden.

DNase I (Reinheitsgrad I) und RNase A, Boehringer Mann-  
heim GmbH, Mannheim.

Alle übrigen eingesetzten Substanzen wiesen den Rein-  
heitsgrad p. A. auf. Natriumdodecylsulfat, Acrylamid  
und Bisacrylamid wurden vor Gebrauch umkristallisiert,  
Phenol und Formamid wurden vor Gebrauch destilliert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Isolierung der 9 S RNS

Trotz widersprüchlicher Resultate über das Vorkommen einer RNS- und Proteinsynthese in reifen Hühnererythrozyten (I. L. Cameron und D. M. Prescott<sup>31</sup>, W. J. Madgwick et al.<sup>32</sup>) stimmen alle Autoren darin überein, daß unreife rote Blutzellen einen größeren Gehalt an mRNS besitzen und eine stärkere Proteinsynthese aufweisen als die ausgereiften Zellen (I. L. Cameron und D. M. Prescott<sup>31</sup>, W. J. Madgwick et al.<sup>32</sup>, K. Scherrer et al.<sup>33</sup>, G. Attardi et al.<sup>34</sup>). Aus diesem Grunde wurden die Tiere mit subkutanen Injektionen von Phenylhydrazin behandelt. Diese Substanz zerstört die im Blutkreislauf befindlichen Erythrozyten und führt zu einer Ausschwemmung der unreifen Vorstufen aus dem Knochenmark. Die Tiere bekommen eine normochrome, makrozytäre Anämie (H. Schall und F. Turba<sup>18</sup>).

Nachdem die Tiere aus der Jugularisvene entblutet worden waren, wurden die gewaschenen Zellen in hypotoner Lösung lysiert. Das Lysat wurde zur Entfernung von Zellkernen, Mitochondrien und nicht aufgeschlossenen Zellen zunächst bei 10 000 x g, der postmitochondriale Überstand zur Sedimentation der Polysomen bei 100 000 x g zentrifugiert. Durch Zugabe von EDTA, das als Komplexbildner Magnesiumionen bindet, wurden die Polysomen in die ribosomalen Untereinheiten und mRNP-Komplexe dissoziiert und anschließend auf einem Saccharosegradienten zentrifugiert (Abb. 1). Die Aufnahme der Extinktion bei 254 nm zeigt neben kleiner (S) und großer (L) ribosomaler Untereinheit eine Schulter auf der Seite geringeren Molekulargewichtes der kleinen Untereinheit. Dieses bei ca. 20 S sedimentierende Material stellt nach S. Schröter<sup>35</sup> einen Komplex aus etwa 25 bis

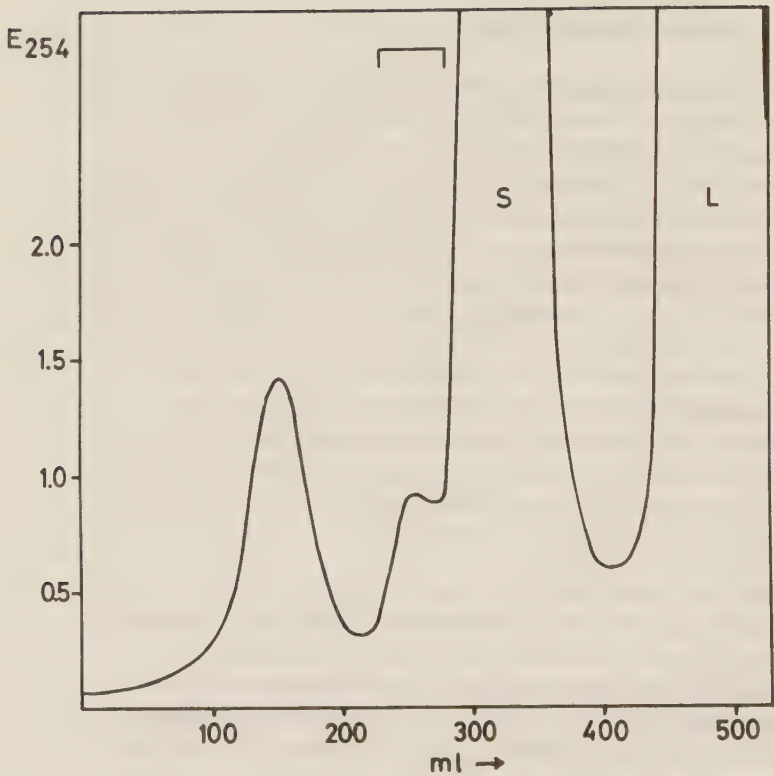


Abb. 1: Circa 300 mg Polysomen wurden in 10 ml Puffer 5 aufgenommen, 0,03 M an EDTA gemacht und auf einen 7 - 32 % Saccharosegradienten in Puffer 5 aufgetragen. Zentrifugiert wurde in einem Spinco Zonal Rotor Ti 14 bei 0°C und 32 000 rpm für 24 Stunden. — Extinktion des eluierten Gradienten bei 254 nm.

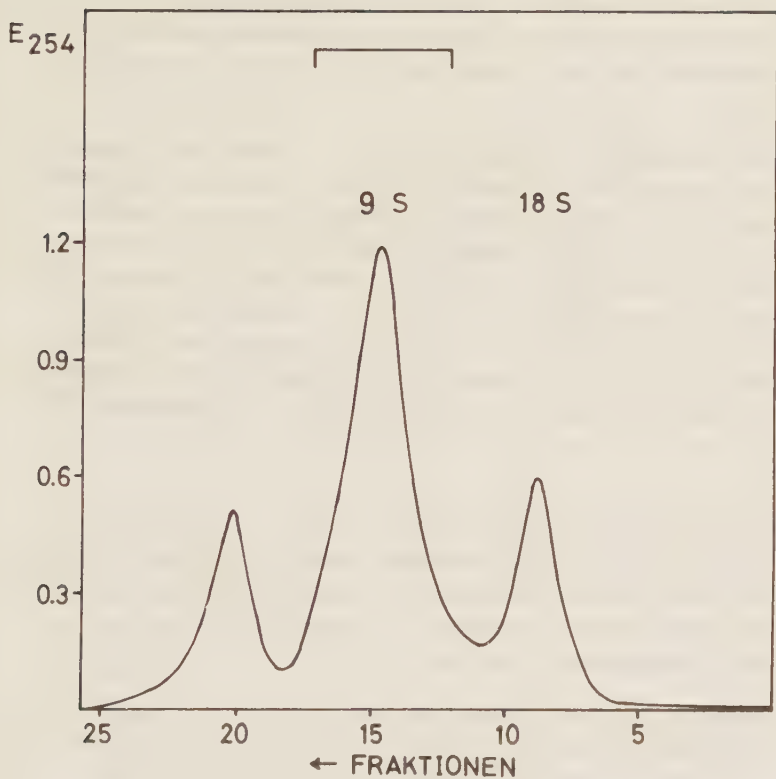


Abb. 2: Die durch eine Klammer in Figur 1 gekennzeichneten Fraktionen wurden nach Zugabe von SDS mit 96 % Äthanol ausgefällt. Das Material wurde in Puffer 5 aufgenommen und je 3 mg auf einen 12 - 30 % Saccharosegradienten in Puffer 5 aufgetragen. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 27 Rotor bei 0°C und 27 000 rpm für 45 Stunden. — Extinktion des eluierten Gradienten bei 254 nm.

30 % 9 S RNS und 70 - 75 % Proteinen dar. Durch Translation im zellfreien System konnte gezeigt werden, daß zumindest ein Teil dieses Materials aus Globin mRNP besteht.

Die Fraktionen, die den RNP-Komplex enthielten, wurden entsprechend den Klammern in Abb. 1 vereinigt, mit SDS versetzt und das mit Äthanol gefällte Material erneut durch einen Saccharosegradienten zentrifugiert (Abb. 2). Hierbei sedimentierte der Hauptanteil der weitgehend von Proteinen befreiten RNS bei 9 - 10 S. Diese RNS Fraktionen wurden vereinigt, zur Entfernung restlicher Proteine mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (H. Aviv und P. Leder<sup>19</sup>) und die so gewonnene 9 S RNS in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 4.2. Auftrennung der 9 S RNS nach dem Poly(A)-Gehalt

Von den verschiedenen Möglichkeiten, Poly(A)-haltige RNS durch Säulenchromatographie abzutrennen, wurden die Methoden mit Cellulose, Oligo(dT)-Cellulose und Poly(U)-Sephrose getestet.

Zunächst wurden Lösungen synthetischer Polyribonucleotide über Säulen (2 ml Inhalt) gegeben, die Cellulose der Klassifizierung Sigmacell type 38 der Fa. Sigma Chemical Co. enthielten. Eluiert wurde mit Puffer 6, der zusätzlich 0,2 mM  $MgCl_2$  enthielt, und Puffer 8 (G. Schutz et al.<sup>20</sup>). Tabelle 1 zeigt das Ergebnis der Verteilung des Eluates in  $E_{260}$  Einheiten und in % auf die beiden Puffer.

Die Resultate zeigen, daß nicht nur Poly(A) sondern auch Poly(G) von der Cellulose gebunden werden. Es soll sich hierbei um  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen der Purinkörper mit Lignin als Verunreinigung der Cellulose handeln (P. A. Kitos et al.<sup>36</sup>).

Tabelle 1

| Polynucleotid | Auftrag<br>in E <sub>260</sub><br>= 100 % | Eluiert mit 0,5 M<br>KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> ,<br>10 mM Tris (pH 7,5) |      | Eluiert mit 10<br>mM Tris<br>(pH 7,5) |      |
|---------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------|------|
|               |                                           | E <sub>260</sub>                                                          | %    | E <sub>260</sub>                      | %    |
| Poly(A)       | 7,42                                      | —                                                                         | —    | 7,18                                  | 96,8 |
| Poly(C)       | 4,40                                      | 3,6                                                                       | 82,0 | 0,47                                  | 10,7 |
| Poly(G)       | 6,68                                      | 0,56                                                                      | 8,4  | 5,45                                  | 81,6 |
| Poly(U)       | 9,08                                      | 8,75                                                                      | 96,4 | —                                     | —    |
| Poly(ACU)     | 5,16                                      | 4,75                                                                      | 92,1 | 0,5                                   | 9,2  |

Im nächsten Versuch wurde Poly(U)-Sepharose 4 B der Fa. Pharmacia Fine Chemicals AB mit synthetischem Poly(A) getestet. Zur Elution wurden wäßrige Lösungen benutzt (R. A. Firtel et al.<sup>21</sup>).

Tabelle 2

| Polynucleotid | Auftrag<br>in E <sub>260</sub><br>= 100 % | Eluiert mit 0,12 M<br>NaCl, 10 mM Tris<br>(pH 7,6), 0,1 mM<br>EDTA, 0,5 % SDS |      | Eluiert mit<br>H <sub>2</sub> O |      |
|---------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------|------|
|               |                                           | E <sub>260</sub>                                                              | %    | E <sub>260</sub>                | %    |
| Poly(A)       | 4,73                                      | 0,58                                                                          | 12,2 | 2,0                             | 42,7 |

Wie Tabelle 2 zeigt, wurden nur ca. 55 % des aufgetragenen Materials eluiert. Wie spätere Untersuchungen erwiesen, war eine vollständige Elution nur mit Formamid als Lösungsmittel möglich. Der Nachteil lag aber

darin, daß Formamid auf Grund seiner hohen Extinktion bei 260 nm eine direkte Messung des eluierten Materials unmöglich machte, und daß dessen Menge erst nach Entfernung des Lösungsmittels ermittelt werden konnte.

Weiterhin wurden von der Fa. Collaborative Research, Inc., Oligo(dT)-Cellulose der Klassifizierung  $T_2$  und  $T_3$  sowie säure- und alkaligewaschene Cellulose (Klassifizierung  $T_4$ ) getestet. Die  $T_3$  Charge hatte Oligo(dT)-Ketten mit bis zu 18 Nucleotiden Länge, die  $T_2$  Charge bis zu 10 Nucleotiden Länge. Als Testsubstanzen wurden synthetisches Poly(A) und Poly(G) verwendet, die stufenweise mit den Puffern 6, 7 und 8 eluiert wurden (H. Aviv und P. Leder<sup>19</sup>).

Von allen getesteten Trägern hatte Oligo(dT)-Cellulose  $T_3$  die besten Eigenschaften zur Abtrennung Poly(A)-haltiger Sequenzen, da 94 % des aufgetragenen Materials erst mit 10 mM Tris (pH 7,5) eluiert werden konnten (Tabelle 3). Bei Oligo(dT)-Cellulose  $T_2$  erwies sich als Nachteil, daß ein beträchtlicher Anteil (ca. 20 %) des Poly(A) schon mit 0,1 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5) von der Säule kam, was eine Abtrennung von Poly(G) verschlechterte. Aus diesem Grund wurde für die Auftrennung der 9 S RNS nach ihrem Poly(A)-Gehalt Oligo(dT)-Cellulose  $T_3$  verwendet.

250 µg der 9 S RNS wurden auf einer 2 ml Säule (Pasteurpipette) aufgetrennt. Tabelle 4 zeigt die prozentuale Verteilung der RNS (bezogen auf das aufgetragene Material als 100 %), die mit den verschiedenen Puffern eluiert wurde.

Insgesamt konnten 95,9 % der aufgetragenen RNS zurückgewonnen werden. Mehr als ein Drittel des Materials wurde bei hoher Ionenstärke an die Säule gebunden,

Tabelle 3

| Träger                                 | Polynucleotid      | Auftrag<br>in E <sub>260</sub><br>= 100 % | Eluiert mit 0,5 M<br>KCl, 10 mM Tris<br>(pH 7,5) |           | Eluiert mit 0,1<br>M KCl, 10 mM<br>Tris (pH 7,5) |          | Eluiert mit 10<br>mM Tris<br>(pH 7,5) |          |
|----------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------|----------|---------------------------------------|----------|
|                                        |                    |                                           | E <sub>260</sub>                                 | %         | E <sub>260</sub>                                 | %        | E <sub>260</sub>                      | %        |
| Oligo(dT)<br>Cellulose T <sub>2</sub>  | Poly(A)<br>Poly(G) | 5,19<br>6,68                              | —<br>2,9                                         | —<br>43,0 | 1,2<br>3,6                                       | 23<br>54 | 3,78<br>0,36                          | 73<br>5  |
| Oligo(dT)-<br>Cellulose T <sub>3</sub> | Poly(A)<br>Poly(G) | 4,9<br>4,5                                | —<br>1,8                                         | —<br>40,0 | —<br>1,93                                        | —<br>42  | 4,6<br>0,9                            | 94<br>20 |
| Cellulose T <sub>4</sub>               | Poly(A)<br>Poly(G) | 4,9<br>4,5                                | 5,26<br>0,95                                     | 107<br>21 | ausge-<br>lassen                                 |          | —<br>3,5                              | —<br>78  |

56,6 % liefen durch. Wenn das nicht gebundene Material auf eine weitere Säule aufgetragen wurde, konnte wiederum keine Bindung beobachtet werden. Das bedeutet, daß die erste Säule nicht über ihre Bindungskapazität hinaus beladen war.

Tabelle 4

| RNS-Fraktion | Elutionspuffer                 | Verteilung der RNS in % |
|--------------|--------------------------------|-------------------------|
| I            | 0,5 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5) | 56,6                    |
| II           | 0,1 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5) | 4,5                     |
| III          | 10 mM Tris (pH 7,5)            | 34,8                    |

#### 4.3. Poly(A)-Gehalt der fraktionierten RNS

Um festzustellen, wie hoch der tatsächliche Poly(A)-Gehalt der durch Oligo(dT)-Cellulose fraktionierten 9 S RNS ist, wurde eine Hybridisierung mit  $^3\text{H}$ -Poly(U) vorgenommen (A. Cann et al.<sup>22</sup>). Dazu wurden bei einem Überschuß von 150 bis 500 Molen  $^3\text{H}$ -Uridin (in  $^3\text{H}$ -Poly(U)) pro Mol 9 S RNS die fraktionierte RNS in 50 % Formamidpuffer hybridisiert und anschließend Aliquote in Puffer mit und ohne Nucleasen nachinkubiert. Nach Trichloressigsäurefällung wurden die Quotienten der gemessenen Radioaktivitäten gebildet, die mit dem Wert des Überschusses an  $^3\text{H}$ -Uridin gegenüber 9 S RNS multipliziert werden müssen, um die durchschnittliche Länge der Poly(A)-Sequenz zu erhalten.

Wie Tabelle 5 zeigt, errechnet sich für die RNS III eine durchschnittliche Länge der Poly(A)-Sequenz von 56 Nucleotiden, für die RNS I eine von 3 Nucleotiden pro Molekül 9 S RNS. Somit ist erwiesen, daß durch

Verwendung der Oligo(dT)-Cellulose-Säulen tatsächlich eine Auftrennung der 9 S RNS nach Poly(A)-Gehalt erreicht werden konnte.

Tabelle 5

| RNS | cpm nach Inkubation |      | Quotient | Überschuß<br>an $^3\text{H}$ -U-<br>ridin zu<br>9 S RNS | Länge der<br>Poly(A)-<br>Sequenz |
|-----|---------------------|------|----------|---------------------------------------------------------|----------------------------------|
|     | +                   | -    |          |                                                         |                                  |
|     | Nucleasen           |      |          |                                                         |                                  |
| III | 205                 | 1360 | 0,1507   | 370                                                     | 56                               |
| I   | 27                  | 1439 | 0,0187   | 178                                                     | 3                                |

#### 4.4. Translation der RNS im zellfreien System aus Ehrlich Aszites Zellen

Zur eindeutigen Identifizierung einer mRNA gehört der Nachweis, daß sie die für ein Protein codierende Nucleotidsequenz besitzt. Zu diesem Zweck wurden die unfractionierte 9 S RNS sowie die nach Poly(A)-Gehalt getrennten RNS Fraktionen I und III in einem zellfreien System aus Ehrlich Aszites Zellen translatiert. Eine erhebliche Steigerung der durch Huhn-Globin mRNA bewirkten Stimulation der Proteinbiosynthese konnte hierbei durch Zugabe einer ribosomalen Waschfraktion erreicht werden (W. Knöchel et al.<sup>12</sup>). Bei diesen Experimenten wurde gefunden, daß die optimalen Bedingungen für die Translation der 9 S RNS bei Ionenkonzentrationen von 95 mM KCl und 2,0 bis 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  lagen.

Die Translationsversuche wurden, um genügend hohe Einbauraten für eine Produktanalyse zu erhalten, als 30fache Ansätze mit je 60  $\mu\text{g}$  RNS durchgeführt (siehe Methoden). Nach Inkubation von 60 Minuten bei 37°C wur-

den 50  $\mu$ l Aliquote abgenommen, deren Aktivität nach KOH-Hydrolyse der RNS bestimmt wurde. Diese Hydrolyse ist unerläßlich, um Aminoacyl-tRNS zu zerstören, die anderenfalls bei Trichloressigsäurefällung falsche Einbauraten vortäuscht. Tabelle 6 zeigt die Aktivitäten und Stimulationsraten der genannten RNS-Fraktionen.

Tabelle 6

| RNS     | cpm $^3\text{H}$ -Lysin eingebaut/50 $\mu$ l Ansatz | Stimulation (%) |
|---------|-----------------------------------------------------|-----------------|
| —       | 6 334                                               | —               |
| 9 S RNS | 125 916                                             | 1 888           |
| RNS I   | 47 484                                              | 650             |
| RNS III | 151 394                                             | 2 290           |

Die höchste Aktivität zeigte RNS III, also das Material, das Poly(A)-Sequenzen enthält. Jedoch war auch bei RNS I noch eine 6,5fache Stimulation der zellfreien Proteinsynthese zu beobachten. Gegenüber der unfraktionierten 9 S RNS zeigte RNS III eine Erhöhung, RNS I dagegen eine Erniedrigung der Einbaurate.

#### 4.5. Produktanalysen

##### 4.5.1. Produktanalyse für Histone

Für die Histonanalyse wurde der Rest der Ansätze (1450  $\mu$ l) bei saurem pH und hoher Ionenstärke extrahiert (siehe Methoden), und das nach Zentrifugation aus dem Überstand gewonnene Material auf 15 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Abb. 3 a + b zeigen die Verteilung der Radioaktivität zusammen mit der Extinktion bei 605 nm einer durch Amidoschwarz gefärbten Histon-Ver-

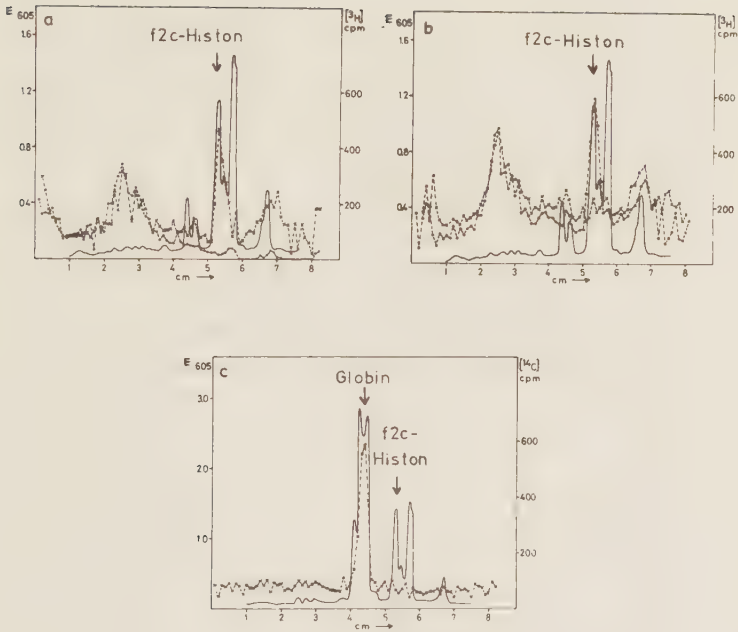


Abb. 3: Die aus den zellfreien Ansätzen durch saure Extraktion gewonnenen basischen Proteine wurden in 50  $\mu\text{l}$  1 M Harnstoff (mit Eisessig auf pH 2,8 eingestellt) auf 15 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Auf Parallelgelen wurden 40  $\mu\text{g}$  unmarkierte Histone aufgetragen.

— Extinktion bei 605 nm nach Färben mit Amidoschwarz; cpm  $^3\text{H}$ -Lysin eingebaut in Gegenwart von a) -o-o- keine RNS; -x-x- unfractionierte 9 S RNS; b) -o-o- RNS I; -x-x- RNS III; c) Elektrophorese von 40  $\mu\text{g}$  unmarkierten Histonen und 80  $\mu\text{g}$   $^{14}\text{C}$ -Leucin markierten Hühner-Globinketten; -x-x- cpm  $^{14}\text{C}$ -Leucin.

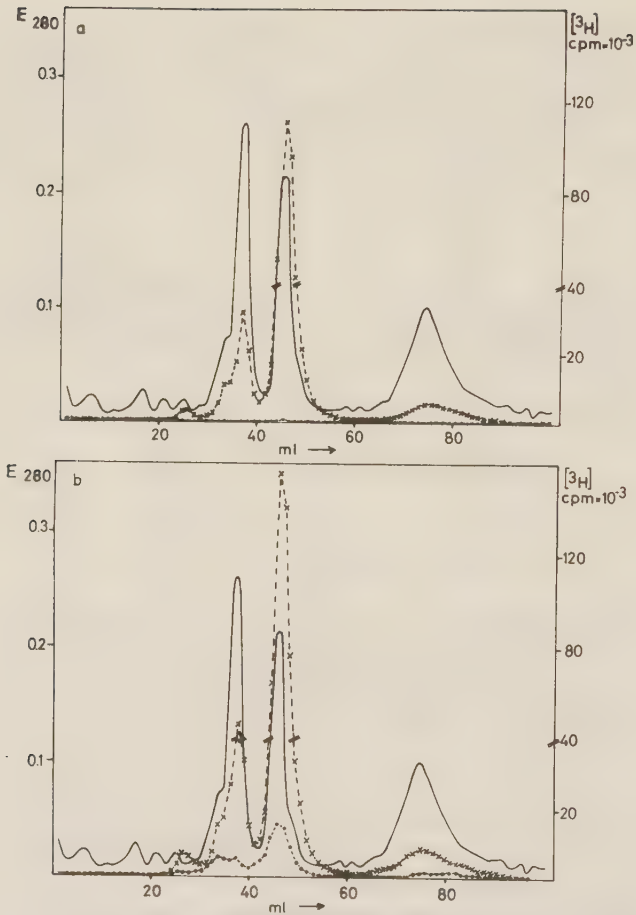


Abb. 4: Sephadex G 100 Chromatographie. Nach Extraktion der basischen Proteine wurde das restliche Material der zellfreien Ansätze zusammen mit 20 mg unmarkierten Globinketten in 7 M Harnstoff (mit 10 M HCl eingestellt auf pH 2,5) aufgenommen und auf Sephadex G 100 Säulen (100 x 1,6 cm) im gleichen Puffer aufgetrennt. — Extinktion bei 280 nm; cpm  $^3\text{H}$ -Lysin eingebaut in Gegenwart von a) -o-o- keine RNS; -x-x- unfractionierte 9 S RNS; b) -o-o- RNS I; -x-x- RNS III.

gleichsprobe.

Zusammen mit dem f2c-Histon, das in der Figur durch einen Pfeil gekennzeichnet ist, erkennt man deutliche Radioaktivitätspeaks bei den Ansätzen mit unfraktionierter 9 S RNS und RNS I, während keine Markierung bei dem Ansatz mit Poly(A)-haltiger RNS III zu erkennen ist. Wie eine Vergleichselektrophorese mit  $^{14}\text{C}$ -Leucin markierten Globinketten zeigt (Abb. 3 c), kommt es zu keiner nennenswerten Kontamination des f2c-Histons mit Globinketten, da beide Substanzen unter den gegebenen Elektrophoresebedingungen ausreichend voneinander getrennt sind. Somit können die Radioaktivitätspeaks an der Position des f2c-Histons in Abb. 3 a + b nicht auf eine Verunreinigung durch Globin zurückgeführt werden. Darüber hinaus werden unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keine neu-synthetisierten Globinketten zusammen mit den basischen Proteinen extrahiert, da keine Aktivitätspeaks in der Globinposition bei 4,2 bis 4,4 cm zu sehen sind. Der Radioaktivitätspeak bei 2,5 cm, der auch im Kontrollansatz ohne zugesetzte RNS vorhanden ist, ist offensichtlich auf eine endogene Proteinsynthese im zellfreien System aus Ehrlich Aszites Tumorzellen zurückzuführen. Dagegen ist die Aktivität im Bereich von 7 cm nur bei den Ansätzen mit zugesetzter RNS zu finden. Ob sie auf bestimmte durch 9 S RNS codierte Proteine oder vielleicht auf Globinkettenfragmente zurückzuführen ist, kann mittels der durchgeführten Experimente nicht entschieden werden.

#### 4.5.2. Produktanalyse für Globinketten

Da die Analyse über Sephadexsäulen und Carboxymethyl-cellulosechromatographie zu einer besseren Auftrennung von Globinketten führt als die Elektrophorese, wurden die nach Histonextraktion erhaltenen Sedimente (siehe

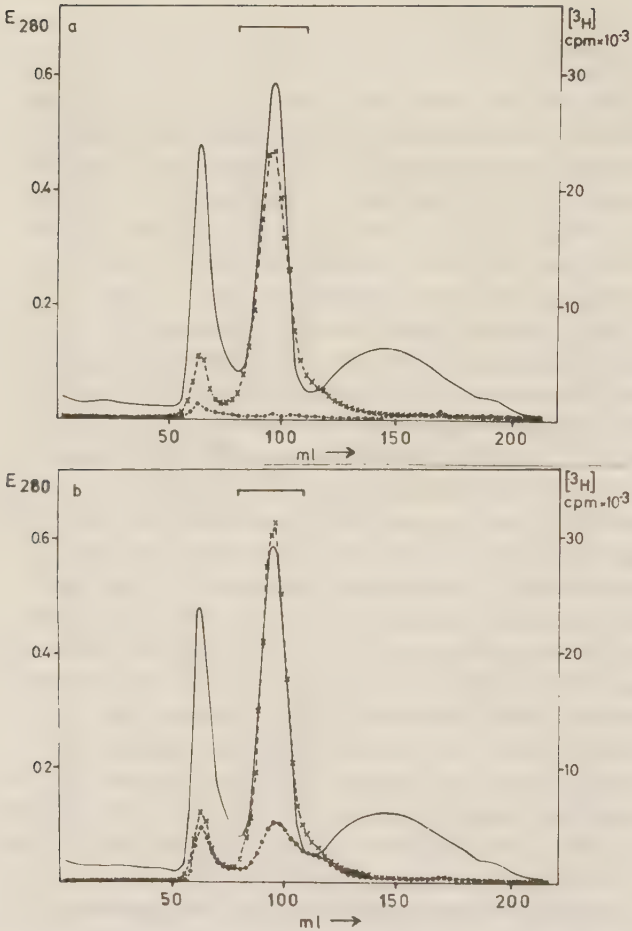


Abb. 5: Carboxymethylcellulose-Chromatographie. Die die Globinketten enthaltenden Fraktionen der Sephadexsäulen (siehe Klammern in Abb. 4) wurden vereinigt und auf Carboxymethylcellulose (CM 52, Whatman) Säulen (0,6 x 15 cm) durch einen 100 ml Gradienten getrennt. Startpuffer: 6 M Harnstoff, 0,127 M Ameisensäure, mit Triäthylamin auf pH 3,54; Endpuffer: 6 M Harnstoff, 0,508 M Ameisensäure, mit Triäthylamin auf pH 5,14. — Extinktion bei 280 nm; cpm <sup>3</sup>H-Lysin eingebaut in Gegenwart von a) -o-o- keine RNS; -x-x- unfractionierte 9 S RNS; b) -o-o- RNS I; -x-x- RNS III.

Methoden) zusammen mit je 20 mg unmarkierten Globinketten in 7 M Urea (pH 2,5) aufgenommen und über Sephadexsäulen chromatographiert. Abb. 4 a + b zeigen das Extinktionsprofil bei 280 nm sowie die Verteilung der Radioaktivität. Der erste Peak ist auf endogene Aszitesproteine zurückzuführen, während der zweite durch die zugesetzten Globinketten entstand. Schon aus dieser Abbildung ist zu erkennen, daß alle eingesetzten RNS-Fractionen im Gegensatz zur Kontrolle eine Globinsynthese bewirken. Der dritte langgezogene Aktivitätsanstieg, der bei früheren Produktanalysen nicht beachtet wurde (W. Knöchel et al.<sup>12</sup>, W. Knöchel<sup>37</sup>, W. Knöchel und H. Tiedemann<sup>38</sup>), muß auf die Besonderheiten der sauren Extraktion zurückzuführen sein. Eine Erklärung kann nicht gegeben werden, jedoch ist ein Abbau neusynthetisierter Globinketten auszuschließen, da das Radioaktivitätsprofil dem Extinktionsprofil nicht folgt.

Die durch Klammern gekennzeichneten Fraktionen, die die Globinketten enthielten, wurden gesammelt, und das Material nach Dialyse gegen den Start-Puffer durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose (CM 52, Whatman) weiter aufgetrennt. Abb. 5 a + b zeigen die Extinktion bei 280 nm und die Verteilung der Radioaktivitäten. Unter den drei durch unmarkierte Globinketten markierten Hauptpeaks findet sich bei allen Ansätzen mit zugesetzter RNS Radioaktivität. Gegenüber unfraktionierter 9 S RNS (Abb. 4 a) weist die Poly(A)-haltige RNS III eine Erhöhung der Globinsynthese pro µg RNS, RNS I dagegen eine beträchtliche Erniedrigung auf (Abb. 4 b). Einen Hinweis auf ein solches Ergebnis ergab schon die Stimulationsrate der zellfreien Ansätze (siehe Tabelle 6).

## 5. Diskussion

9 S RNS aus unreifen roten Hühner-Blutzellen wurde nach Dissoziation der Polysomen aus dem bei ca. 20 S sedimentierenden RNP-Komplex isoliert. Von den verschiedenen Möglichkeiten zur Abtrennung Poly(A)-haltiger Sequenzen wurden die Methoden mit Cellulose, Poly(U)-Sepharose und Oligo(dT)-Cellulose getestet. Dabei erwies sich Oligo(dT)-Cellulose am geeignetsten, weil erstens von verschiedenen Polynucleotiden Poly(A) am selektivsten gebunden wurde und weil zweitens mit wäßrigen Lösungen eluiert werden konnte, was eine direkte Extinktionsmessung ermöglichte.

Circa ein Drittel der aufgetragenen 9 S RNS wurde von Oligo(dT)-Cellulose bei hoher Ionenstärke gebunden. Eine Hybridisierung mit  $^3\text{H}$ -markiertem Poly(U) ergab für diese Fraktion eine durchschnittliche Länge der Poly(A)-Sequenz von 56 Nucleotiden. Diese Zahl stimmt gut mit bisher publizierten Werten überein, wonach in roten Blutzellen von Enten pulsmarkierte, neusynthetisierte Globin mRNA am 3'-OH Ende zwar bis zu 200 Nucleotide Adenylsäure enthalten soll, diese Sequenz aber mit der Alterung der mRNA abgebaut wird, so daß der Durchschnittswert bei ca. 85 Nucleotiden liegen soll (R. E. Pemberton und C. Baglioni<sup>39</sup>). Gleichartige Ergebnisse, daß die Poly(A)-Sequenz mit dem Alter der mRNA kürzer wird, konnten auch mit HeLa-Zellen erreicht werden (D. Sheiness und J. E. Darnell<sup>40</sup>).

Der Anteil der RNS, der nicht von Oligo(dT)-Cellulose gebunden wurde, betrug 56,6 %. Aus dem Hybridisierungstest mit  $^3\text{H}$ -Poly(U) ergab sich, daß ein Molekül der nicht adsorbierten 9 S RNS im Durchschnitt 3 Nucleotide Adenylsäure enthielt. Diese Fraktion enthielt also keine längere Poly(A)-Sequenz.

9 S RNS sowie die nach Poly(A)-Gehalt aufgetrennten Fraktionen wurden in einem zellfreien Proteinsynthesystem aus Ehrlich Aszites Zellen in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Lysin translatiert. In allen Fällen konnte durch RNS Zugabe eine Stimulation der Proteinsynthese (Einbaurrate von  $^3\text{H}$ -Lysin) beobachtet werden. Gegenüber unfractionierter 9 S RNS war die Einbaurrate durch Poly(A)-haltige RNS leicht erhöht, durch die RNS Fraktion ohne Poly(A) dagegen um ca. zwei Drittel erniedrigt.

Aus den zellfreien Ansätzen wurden durch saure Extraktion die basischen Proteine gewonnen. Die Produktanalyse auf f2c-Histon mittels Polyacrylamidgelelektrophorese ergab, daß neben unfractionierter 9 S RNS nur die RNS Fraktion ohne Poly(A) f2c-Histon mRNS enthielt. Durch Auftrennung über Oligo(dT)-Cellulose Säulen und Elimination der Poly(A)-haltigen RNS konnte also eine Anreicherung an f2c-Histon mRNS erzielt werden. Die Einbaurrate von  $^3\text{H}$ -Lysin in f2c-Histon pro  $\mu\text{g}$  eingesetzte RNS war erhöht.

Aus den Ergebnissen darf man schließen, daß Histon mRNS aus unreifen roten Blutzellen, wie bereits bei anderen Geweben gefunden, keine Poly(A)-Sequenz aufweist (M. Adesnik und J. E. Darnell<sup>9</sup>, J. R. Greenberg und R. P. Perry<sup>10</sup>, M. Nemer<sup>11</sup>). Die Ursache hierfür ist bis heute unbekannt. Jedoch kann man aus der Tatsache, daß Cordycepin keinen Hemmeffekt auf die Synthese von Histon mRNS hat (M. Adesnik et al.<sup>41</sup>), und daß Histon mRNS nach Pulsmarkierung mit  $^3\text{H}$ -Uridin schneller als die übrige mRNS Population im Cytoplasma nachweisbar ist (M. Adesnik und J. E. Darnell<sup>9</sup>), eventuell folgern, daß Histon mRNS anderen Regulationsmechanismen auf der Ebene der Transkription oder des Processing unterliegt als die Hauptmenge der zellulären mRNS.

Die Produktanalyse auf Globinketten mittels Sephadex G 100 Chromatographie und an Carboxymethylcellulose ergab, daß unfraktionierte 9 S RNS, Poly(A)-haltige als auch die nicht Poly(A)-enthaltende RNS im zellfreien System Globinketten synthetisieren. Gegenüber unfraktionierter 9 S RNS konnte für die Poly(A)-haltige RNS ein Anstieg, für nicht Poly(A)-haltige eine starke Herabsetzung der Globinsynthese pro  $\mu\text{g}$  RNS beobachtet werden. Daß die letztere Fraktion überhaupt eine Globinsynthese aufweist, könnte auf den Umstand zurückzuführen sein, daß Globin mRNS ihr Poly(A)-Sequenz entweder durch enzymatischen Abbau unter physiologischen Bedingungen bei der Alterung (R. E. Pemberton und C. Baglioni<sup>39</sup>, D. Sheiness und J. E. Darnell<sup>40</sup>) oder während der Isolierung der RNS zum Teil verloren hat. Ferner konnte von mehreren Autoren gezeigt werden, daß Globin mRNS aus Kaninchenretikulozyten ohne Poly(A)-Sequenz im zellfreien Proteinsynthesystem mit gleicher Effizienz translatiert wird wie Poly(A)-haltige RNS (H. Soreq et al.<sup>42</sup>, A. E. Sippel et al.<sup>43</sup>). Unter dieser Voraussetzung läßt sich aus der Synthesekapazität die Verteilung der Globin mRNS auf beide Fraktionen berechnen. Multipliziert man die spezifische Globinsyntheseaktivität (cpm unter den drei Globinpeaks in Abb. 5) pro  $\mu\text{g}$  RNS mit der Gesamtmenge der RNS in der jeweiligen Fraktion, so ergibt sich, daß 24,1 % der Globin mRNS in der nicht Poly(A)-haltigen und 75,9 % in der Poly(A)-haltigen RNS enthalten sind.

Über die tatsächliche Menge an f2c-Histon mRNS in der unfraktionierten 9 S RNS oder der nicht Poly(A)-haltigen RNS Fraktion kann keine definitive Aussage gemacht werden. Ausgehend vom <sup>3</sup>H-Lysin Einbau in f2c-Histon und Globin kommt man zu dem Ergebnis, daß f2c-Histon mRNS weit weniger als 1 % der RNS ausmacht. Jedoch muß

dabei berücksichtigt werden, daß das zellfreie System hinsichtlich optimaler Ionenbedingungen für die Translation der f2c-Histon mRNA nicht variiert wurde, und daß generell die Effizienz der Translation von Globin mRNA und f2c-Histon mRNA sehr unterschiedlich sein kann. Im übrigen kann der Gehalt an f2c-Histon mRNA an der 9 S RNS auch davon abhängen, welche Fraktionen des zweiten Saccharosegradienten für den 9 S Pool verwendet wurden, da die genaue Position der f2c-Histon mRNA auf dem Gradienten nicht bekannt ist.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde 9 S RNS aus unreifen roten Hühnerblutzellen nach ihrem Poly(A)-Gehalt aufgetrennt und in einem zellfreien Proteinsynthesystem aus Ehrlich Aszites Tumorzellen translatiert. Zur Isolation der 9 S RNS wurden Polysomen mit EDTA in ribosomale Untereinheiten und in nichtribosomalen RNP-Komplex dissoziiert und in einem Zonalrotor über einen Saccharosegradienten zentrifugiert. Der bei etwa 20 S sedimentierende RNP-Komplex wurde durch SDS-Zugabe weitgehend von Proteinen befreit und die 9 S RNS durch eine weitere Saccharosegradientenzentrifugation mit anschließender Phenolextraktion gereinigt. Zur Fraktionierung nach Poly(A)-Gehalt wurde das unterschiedliche Ausmaß der Hybridisierung mit Oligo(dT)-Cellulose ausgenutzt. Der tatsächliche Poly(A)-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde durch Hybridisierung mit  $^3\text{H}$ -markiertem Poly(U) ermittelt.

Die Translation mit nachfolgender Produktanalyse ergab, daß 9 S RNS neben Globin mRNA auch f2c-Histon mRNA enthielt. Wenn die 9 S RNS über Oligo(dT)-Cellulose fraktioniert wurde, konnte in der Poly(A)-haltigen Fraktion keine f2c-Histon mRNA nachgewiesen werden, während die Fraktion, die nicht an Oligo(dT)-Cellulose gebunden wurde, neben beträchtlichen Mengen Globin mRNA (25 % der Globin mRNA) die gesamte f2c-Histon mRNA enthielt. Somit kann die Tatsache, daß f2c-Histon mRNA in unreifen roten Blutzellen aus Hühnern keine Poly(A)-Sequenz aufweist, zur quantitativen Abtrennung von Poly(A)-haltiger Globin mRNA dienen.

7. Literaturverzeichnis

1. F. Jacob und J. Monod,  
J. Mol. Biol., 3 (1961) 318-356.
2. M. F. Singer und P. Leder,  
Ann. Rev. Biochem., 35 (1966) 195-230.
3. H. Chantrenne, A. Burny und G. Marbaix,  
Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 7 (1967)  
173-194.
4. K. Scherrer und L. Marcaud,  
J. Cell. Physiol., 72, suppl. 1 (1968) 181-212.
5. J. Kates,  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 35 (1970)  
743-752.
6. J. Mendecki, S. Y. Lee und G. Brawerman,  
Biochemistry, 11 (1972) 792-798.
7. G. R. Molloy, M. B. Sporn, D. E. Kelley und R. P.  
Perry,  
Biochemistry, 11 (1972) 3256-3260.
8. M B. Mathews,  
Essays in Biochemistry, Academic Press, London/  
New York, 9 (1973) 59-102.
9. M. Adesnik und J. E. Darnell,  
J. Mol. Biol., 67 (1972) 397-406.
10. J. R. Greenberg und R. P. Perry,  
J. Mol. Biol., 72 (1972) 91-98.
11. M. Nemer,  
Cell, 6 (1975) 559-570.
12. W. Knöchel, D. Hendrick, S. Schröter und H. Tie-  
demann,  
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354 (1973) 1389 -  
1394.

13. R. Appels und J. R. E. Wells,  
J. Mol. Biol., 70 (1972) 425-434.
14. M. A. Billet und J. M. Barry,  
Eur. J. Biochem., 49 (1974) 477-484.
15. M. Breindl und D. Gallwitz,  
Eur. J. Biochem., 32 (1973) 381-391.
16. M. Jacobs-Lorena, C. Baglioni und T. W. Borun,  
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 69 (1972) 2095-2099.
17. A. Garel, A. Mazen, M. Champagne, A. Sautiere,  
D. Kmiecik, O. Loy und G. Biserte,  
FEBS letters, 50 (1975) 195-199.
18. H. Schall und F. Turba,  
Biochem. Zeitschr., 339 (1963) 219-223.
19. H. Aviv und P. Leder,  
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 69 (1972) 1408-1412.
20. G. Schutz, M. Beato und P. Feigelson,  
Biochem. Biophys. Res. Com., 49 (1972) 680-689.
21. R. A. Firtel, A. Jacobson und H. F. Lodish,  
Nat. New Biol., 239 (1972) 225-228.
22. A. Cann, R. Gambino, J. Banks und A. Bank,  
J. Biol. Chem., 249 (1974) 7536-7540.
23. M. Mathews und A. Korner,  
Eur. J. Biochem., 17 (1970) 328-338.
24. S. M. Heywood,  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34 (1969)  
799-803.
25. R. E. Lockard und J. B. Lingrel,  
Nat. New Biol., 233 (1971) 204-206.
26. G. Shapira, J. Rosa, N. Maleknia und P. Padieu,  
Methods Enzymol., 12 B (1968) 749-750.

27. S. Panyim und R. Chalkley,  
Arch. Biochem. Biophys., 130 (1969) 337-346.
28. R. Appels, J. R. E. Wells und A. F. Williams,  
J. Cell Sci., 10 (1972) 47-59.
29. D. Hendrick, W. Knöchel, W. Schwarz, S. Pitzel  
und H. Tiedemann,  
Develop. Biol., 36 (1974) 299-310.
30. M. Zeitlin und V. Hariharasubramanian,  
Anal. Biochem., 35 (1970) 296-297.
31. I. L. Cameron und D. M. Prescott,  
Exp. Cell Res., 30 (1963) 609-612.
32. W. J. Madgwick, N. Maclean und Y. A. Baynes,  
Nat. New Biol., 238 (1972) 137-139.
33. K. Scherrer, L. Marcaud, F. Zajdela, I. M. London  
und F. Gros,  
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 56 (1966) 1571-1578.
34. G. Attardi, H. Parnas und B. Attardi,  
Exp. Cell Res., 62 (1970) 11-31.
35. S. Schröter,  
Dissertation, Freie Universität Berlin, Berlin  
(1976).
36. P. A. Kitos und H. Amos,  
Biochemistry, 12 (1973) 5086-5091.
37. W. Knöchel,  
Mol. Biol. Reports, 1 (1974) 311-320.
38. W. Knöchel und H. Tiedemann,  
Biochim. Biophys. Acta, 378 (1975) 383-393.
39. R. E. Pemberton und C. Baglioni,  
J. Mol. Biol., 81 (1973) 255-260.
40. D. Sheiness und J. E. Darnell,  
Nat. New Biol., 241 (1973) 265-268.

41. M. Adesnik, M. Salditt, W. Thomas und J. E. Darnell,  
J. Mol. Biol., 71 (1972) 21-30.
42. H. Soreq, U. Nudel, R. Salomon, M. Revel und U. Z. Littauer,  
J. Mol. Biol., 88 (1974) 233-245.
43. A. E. Sippel, J. G. Stavrianopoulos, G. Schutz und P. Feigelson,  
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 71 (1974) 4635-4639.

## Lebenslauf

Am 7. 2. 1945 wurde ich, Walter Knöchel, als erster Sohn des Arztes Dr. med. Walter Knöchel und seiner Ehefrau Marianne, geb. Ewald, in Marburg an der Lahn geboren.

1949 verlegten meine Eltern unseren Wohnsitz nach Essen, wo ich von 1951 bis 1955 die Albert-Schweitzer-Grundschule besuchte. Von Ostern 1955 an besuchte ich das Helmholtz-Gymnasium in Essen. Dort bestand ich im März 1964 die Reifeprüfung.

Zum Sommersemester 1964 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Chemie. Nach dem Vordiplom 1966 studierte ich als zweites Fach Humanmedizin. 1967 bestand ich das Vorphysikum, 1969 die Diplomhauptprüfung und 1970 das Physikum. Im April 1970 begann ich bei Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann am Institut für Molekularbiologie und Biochemie als wissenschaftlicher Assistent mit meiner ersten Dissertation, die ich im Dezember 1972 mit dem Dr. rer. nat. abschloß. Im August 1975 bestand ich das medizinische Staatsexamen. Zur Zeit bin ich als Assistenzprofessor am Institut für Molekularbiologie und Biochemie tätig.





